

Aus dem
Institut für Infektionsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

***Klebsiella* spp. in Bodenproben:
Vorkommen und Expression von
Pathogenitätsmerkmalen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Gerrit Rendtorff
aus Kiel

Kiel 2009

Meinen Eltern

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Podschun

2. Berichterstatter: PD Dr.Gläser

Tag der mündlichen Prüfung: 16.3.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.3.2010

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BHI	Brain-Heart-Infusion (Medium)
C3, C3b usw.	Komplementfaktoren (Proteine der Komplementkaskade)
spp.	Spezies

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Material	6
2.1.1	Geräte	6
2.1.2	Kleingeräte und Chemikalien	6
2.1.3	Nährmedien und Puffer	6
2.2	Methoden	8
2.2.1	Entnahme der Bodenproben	8
2.2.2	Verarbeitung der Bodenproben und Isolierung der Bakterien	8
2.2.3	Spezies-Bestimmung	8
2.2.4	Stammhaltung	11
2.3	Bestimmung der Serumempfindlichkeit	11
2.3.1	Serumgewinnung	11
2.3.2	Serumresistenztest	11
2.4	Kapseltypisierung	12
2.5	Statistische Berechnungen	12
3	Ergebnisse	13
3.1	Nachweishäufigkeit	13
3.2	Speziesverteilung	14
3.3	Kapseltypen	16
3.4	Serumresistenz	19
4	Diskussion	20
4.1	Vorkommen in Umwelthabitaten	20
4.2	Speziesverteilung	21

4.3	Nachweis von Virulenzfaktoren	22
5	Zusammenfassung	26
6	Literaturverzeichnis	28
7	Danksagung	34
8	Lebenslauf	35

1 Einleitung

Klebsiellen, gramnegative, aerobe, bekapselte und unbewegliche Stäbchenbakterien, gehören der Familie der Enterobacteriaceae an. Sie kommen einerseits ubiquitär in der Umwelt (Boden, Wasser, Pflanzen) (Bagley 1985) vor, andererseits sind sie bei Menschen und warmblütigen Säugetieren als Saprophyten im Nasopharynx und im Gastrointestinaltrakt zu finden (Podschun und Ullmann 1998b; Bagley et al. 1978; Brown und Seidler 1973; Krech und Sonnabend 1969; Matsen et al. 1974). Aktuell finden sich zudem Berichte über den Nachweis von Klebsiellen in Küchenschaben in Krankenhäusern sowie bei Labornagetieren (Zarchi und Vatani 2009; Bleich et al. 2008). Klebsiellen sind fakultativ pathogen und als häufige Erreger nosokomialer Infektionen in der Infektiologie sowie in der Krankenhaushygiene von großer Bedeutung, wobei Infektionen des Respirationstraktes (Rüden 1995), des Urogenitaltraktes sowie Septikämien und Wundinfektionen vorherrschen. Besonders gefährdet sind Patienten, die wegen Grunderkrankungen unter einer allgemeinen Abwehrschwäche leiden, z. B. Patienten mit Diabetes mellitus, chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen, Immundefekten, neoplastischen Erkrankungen oder ältere und neugeborene Personen (Eisenstein 2000; Janda und Abbott 1998; Podschun und Ullmann 1998a,b; Clegg und Sebghati 2001).

K. pneumoniae ist nach *Escherichia coli* der zweithäufigste gramnegative Erreger von Septikämien (Eisenstein 2000) und der dritthäufigste gramnegative Erreger nosokomialer Infektionen des Urogenitaltraktes. *Klebsiella spp.* sind häufige Erreger nosokomialer Wundinfektionen (Mayhall 1987), sowie unter den häufigsten Erregern ambulant erworbener und -unbehandelt- mit hoher Letalität behafteter Pneumonien (Horan et al. 1988; Bouza und Cercenado 2002). Bezüglich der ambulant erworbenen Pneumonien weisen Alkoholranke das höchste Risiko auf, eine derartige Pneumonie zu entwickeln (Carpenter 1990; Torres et al. 1991; Prince et al. 1997; Ishida et al. 1998). *Klebsiella* gehört zu den vier häufigsten Pneumonieinfektionserregern auf Neugeborenen-Intensivstationen und ist der zweithäufigste Erreger bei Neugeborenenensepsis, die sich als *early*- oder *late-onset*-Sepsis manifestieren kann (Hart 1993; Sahly und Podschun 1997; Abdel-Hady et al. 2008). Eine weitere zunehmende durch *Klebsiella pneumoniae* hervorgerufene, ambulant

erworbene Infektionskrankheit ist der vor allem im asiatischen Raum vorkommende pyogene Leberabszess (Pan et al. 2008).

Klebsiellen gelten aufgrund zunehmender multipler Antibiotikaresistenzen als Problemkeime: Neben der primären Resistenz gegen Ampicillin und Carbenicillin werden auch zunehmend Resistenzen gegen Cephalosporine und Aminoglykoside beobachtet (Eisenstein, 2000; Kresken et al., 2006). Klinisch und epidemiologisch gewinnen besonders Extended-Spectrum β -Lactamasen produzierende Stämme an Bedeutung, die durch die Produktion dieser Lactamasen einen weiteren Resistenzmechanismus erworben haben (Eisenstein 2000; Bauerfeind et al. 1993; D'Agata et al. 1998; French et al. 1996). Aktuell gibt es sogar Berichte über zunehmende Vorkommen von Carbapenemresistenten Stämmen von *Klebsiella pneumoniae* im klinischen Bereich (Pitout 2008; Woodford et al. 2008). Die Manifestation einer Infektion durch Mikroorganismen wird zum einen durch die individuelle Immunreaktion des Makroorganismus und zum anderen durch die spezifischen Virulenzfaktoren des Erregers bestimmt.

Die individuelle Immunreaktion des Wirtsorganismus ist in der Frühphase hauptsächlich durch unspezifische primäre Abwehrmechanismen wie die Phagozytose durch Granulozyten und die Serumbakterizidie durch lösliche Blutfaktoren charakterisiert, während in der Spätphase die spezifische zelluläre und humorale Abwehr dominiert (Woolcock 1988). Die Fähigkeit von Mikroorganismen, diese Abwehrmechanismen zu umgehen, bestimmt das Ausmaß ihrer Pathogenität mit. Sie haben dazu verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Abwehr zu umgehen, die so genannten Virulenzfaktoren.

Die Virulenz von Klebsiellen hängt zum einen von der Bildung von Siderophoren und Fimbrien, zum anderen besonders von ihrem Serumresistenzverhalten, sowie einer dicken Polysaccharidkapsel ab (Ciurana und Tomás 1987; Cryz et al. 1984; Highsmith und Jarvis 1985; Domenico et al. 1985).

Dabei wird die bakterizide Wirkung des Serums hauptsächlich durch das Komplementsystem vermittelt, welches auf drei Wegen aktiviert werden kann: Zum einen über den klassischen Weg, bei dem eine Interaktion von spezifischen Antikörpern mit Oberflächenantigenen des Bakteriums vorausgeht, zum anderen über den Lektin

Weg, bei dem Mannose-bindendes Lektin auf der bakteriellen Oberfläche bindet, und zum dritten auf dem alternativen Weg, bei dem die Aktivierung der Komplementkaskade durch direkte Interaktion von Oberflächenpolysacchariden und Zellwandbestandteilen mit den Komplementfaktoren des Serums stattfindet (Frank 1980; Taylor 1983; Woolcock 1988). Alle Wege führen letztendlich zur Aktivierung von C3 zu C3b, welches als Opsonin der Bakterien die Phagocytose durch Granulocyten und Makrophagen anregt und die Bildung des Lysekomplexes C5b-9 initiiert, der die Bakterienzelle zerstört. Die Mechanismen der Serumresistenz sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheinen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Ionengehalt, spezifische Oberflächenproteine und die Kapsel, ganz besonders aber die Struktur der O-Antigene das Resistenzverhalten zu beeinflussen (Merino et al. 1992; Kato und Bito 1978; Wardlaw 1962).

Bestimmte Kapseltypen, bestehend aus komplexen sauren Polysacchariden, bieten einerseits direkten Schutz vor Phagozytose (Highsmith und Jarvis 1985; Podschun und Ullmann 1998a), andererseits erschweren sie durch Interaktion der Kapselpolysaccharide mit den Komplementfaktoren eine Aktivierung der Komplementkaskade und verhindern eine Opsonierung durch Komplement (Merino et al. 1992; Rozenberg-Arska et al. 1986; Tomás et al. 1991; van Dijk et al. 1979). Weiterhin vermittelt die Kapsel eine Resistenz gegen antimikrobielle Peptide im Respirationstrakt, die als „Waffe“ des angeborenen Immunsystems gegen Atemwegsinfektionen fungieren (Campos et al. 2004). Es sind gegenwärtig 77 verschiedene Kapseltypen zu unterscheiden, die zur Serotypisierung herangezogen werden (Ørskov und Five-Asbury 1977; Podschun und Ullmann 1998a,b; Ørskov und Ørskov 1984; Williams und Thomas 1990). Auch wenn bislang nur wenige Kapseltypen diesbezüglich eingehend untersucht wurden, so scheinen sie sich doch hinsichtlich Ihrer Virulenz zu unterscheiden. So erwiesen sich Klebsiellen-Stämme der Kapseltypen K1 und K2 als deutlich virulenter als beispielsweise der Kapseltyp K7 (Podschun et al. 1992; Podschun und Ullmann 1992 und 1998; Simoons-Smit et al. 1984; Yu et al. 2007).

Aus klinischem Material wird am häufigsten die Spezies *K. pneumoniae* isoliert, gefolgt von den Spezies *K. oxytoca* und *K. planticola*. *K. terrigena* hingegen als vermeintlich nur in der Umwelt vorkommende Klebsiellenspezies wird klinisch eher für bedeutungslos gehalten (Bagley 1985; Podschun et al. 2000). Nach aktueller Taxo-

nomie (Drancourt et al. 2001) hat sich die Nomenklatur für *Klebsiella planticola* in *Raoultella planticola*, die für *Klebsiella terrigena* in *Raoultella terrigena* geändert; in der vorliegenden Arbeit werden die synonymen Bezeichnungen verwendet.

Bei den einzelnen Klebsiellenspezies wird eine unterschiedliche Habitatpräferenz angenommen: *K. pneumoniae* und *K. planticola*-Vorkommen bei Mensch und Tier, in verschmutzten Gewässern und Böden; *K. oxytoca*: häufiges Vorkommen in vielen Habitaten und *K. terrigena*: Vorkommen in unverschmutzten Gewässer- und Bodenproben sowie in Vegetationen (Bagley 1985).

Die Häufigkeit und Verteilung der verschiedenen Spezies aus klinischen Materialien ist relativ gut untersucht (Podschun und Ullmann 1994; Hidron et al. 2008). Nach herrschender Lehrmeinung kommen *Klebsiellen* ubiquitär in der belebten und unbelebten Umwelt vor. Diese Annahme basiert jedoch vorwiegend auf einzelnen Fallberichten, die wenige Stämme beispielsweise auf Bäumen (Duncan und Razzell 1972) und auf der Oberfläche von Früchten (Knittel et al. 1977) nachweisen konnten.

Über die grundsätzliche Verbreitung von Klebsiellen in der Umwelt sowie die Ausbildung von Virulenzfaktoren von Umweltklebsiellen finden sich ebenfalls nur sporadische Daten mit wenigen Stämmen. Lediglich in einer systematischen Arbeit über das Vorkommen von *Klebsiella spp.* in Oberflächengewässern (Podschun et al. 2001) konnte anhand eines größeren Probenkollektives nachgewiesen werden, dass Klebsiellen in oberflächennahen Gewässerproben ubiquitär vorkommen und dass die hier isolierten Stämme seltener Pathogenitätsmerkmale ausbilden als klinische Isolate. Umfassende, systematische Untersuchungen über *Klebsiella*-Isolate aus anderen Habitaten, wie z.B. nativem Erdboden liegen bis dato noch nicht vor.

Durch die vorliegende Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob Klebsiellen auch in Bodenproben ubiquitär vorkommen. Zudem soll die Frage geklärt werden, ob die aus Bodenproben isolierten *Klebsiella spp.* ähnliche Pathogenitätsmerkmale aufweisen wie klinische Isolate und ggf. als Reservoir für *Klebsiella*-Infektionen in Betracht kommen kann.

Die vorliegende Arbeit sollte folgende konkreten Fragestellungen bearbeiten:

1. Wie häufig sind Klebsiellen im Umwelt-Habitat natürlicher Erdboden zu finden? Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die in Norddeutschland drei vorherrschenden Vegetationshabitats Wald, Knick/Feldrandhecke und Wiese gelegt.
2. Wie sieht die Speziesverteilung bei Klebsiellen aus diesen Habitats aus? Unter der Annahme, dass *K. pneumoniae* ein häufiger humanpathogener Erreger ist, während *K. terrigena* in erster Linie nur als in der Umwelt vorkommende Spezies gilt, würde man ein deutlich häufigeres Vorkommen letzterer im Habitat Erdboden erwarten.
3. Bilden Umweltklebsiellen als vermutlich weniger pathogenes Klebsiellenkollektiv seltener Virulenzfaktoren aus als Klebsiellen aus klinischen Materialien?

In der vorliegenden Arbeit wird dies exemplarisch anhand der Virulenzfaktoren Serumresistenz sowie Kapselbildung untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
Brutschrank, Typ B 50	Memmert, Schwabach
Photometer, Colorimeter 252	Ciba-Corning, Fernwald
Überkopfschüttler, REAX 2000	Heidolph, Kielheim
Spiralplater, Model D	Spiral Systems, Ohio
Rüttler, Vortex-Genie	Binder & Hobein AG, Zürich
Waage, BP 2105	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge, Labofuge	Heraeus, Hanau

2.1.2 Kleingeräte und Chemikalien

Eppendorf-Pipetten, sterilen Spitzen	Eppendorf, Hamburg
Sterile Glaspipetten, 10 ml	
Mikrotiterplatten mit U-Boden	Greiner, Nürtingen
Gestopfte Pasteurpipetten, 230 mm	Assistent
Plastikröhrchen 10 und 50 ml, konisch, mit Schraubverschluss	Greiner, Nürtingen
API 20E-Teststreifen	bioMérieux, Frankreich
Bactident-Oxidase-Teststreifen	Merck, Darmstadt
Einmal-Petrischalen, 9 cm Durchmesser, steril	
<i>Klebsiella</i> -Antiseren	

2.1.3 Nährmedien und Puffer

Klebsiella-Selektivagar: Citrat-Agar mit 1% myo-Inosit (van Kregten et al., 1984)

Nach Lösen von 22,5 g der Citratagar-Grundsubstanz (Merck, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. wurde myo-Inosit (Endkonzentration 1%) hinzugefügt und das Gemisch für 15 min bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung in sterile Petrischalen à 20 ml abgefüllt.

Nutrient Broth No. 2, Nährbouillon

Die Trockensubstanz (25 g, Oxoid, Wesel) wurde in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde in Reagenzgläser à 10 ml abgefüllt und anschließend 15 min bei 121°C autoklaviert.

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2

NaCl	8,0 g	MG 58,44	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	1,58 g	MG 174,20	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	0,34 g	MG 136,09	Merck, Darmstadt

wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Der pH-Wert wurde mit 10%igem Natriumhydroxid bzw. mit 30%iger Salzsäure eingestellt.

Brain-Heart-Infusion-Agar: Hirn-Herz-Infusion-Agar

Fertigmischung (52 g, Difco, Hamburg) wurde in 1000 ml gelöst, für 15 min bei 121°C autoklaviert (pH 7,2-7,6) und anschließend in sterile Petrischalen à 20 ml gegeben.

Chinablau-Lactose-Agar

D.S.T. Agar (Oxoid CM 261)	40,0 g
Laktose, DAB	25,0 g
Aqua dest.	1000 ml

Die Substanzen wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50°C wurden 20 ml einer 2%igen Methylblau-Lösung als pH-Indikator steril hinzugefügt und die Lösung in sterile Petrischalen à 20 ml abgefüllt.

Brain-Heart-Infusion-Bouillon (Difco, Hamburg) (Hirn-Herz-Infusion-Bouillon)

BHI-Grundsubstanz (37 g) wurde in 1000 ml Aqua dest. gelöst, in Reagenzgläser à 10 ml abgefüllt und anschließend für 15 min bei 121°C autoklaviert (pH 7,2-7,6).

Worfel-Ferguson-Agar:

Hefe-Extrakt	2,0 g
Magnesium-Sulfat (MgSO ₄) x 7 H ₂ O	0,25 g
Kalium-Sulfat (K ₂ SO ₄)	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	2,0 g
Saccharose	20,0 g
Bacto-Agar	15,0 g

Die Substanzen wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und bei 121° für 15 min autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung in sterile Petrischalen à 20 ml gefüllt (pH 6,3-7,6).

2.2 Methoden

2.2.1 Entnahme der Bodenproben

Die Proben wurden im Zeitraum Mai-Dezember 2003 aus verschiedenen natürlichen, landwirtschaftlich nicht genutzten Böden (Wald, Wiese, Knick/Feldrandhecke) in Schleswig-Holstein entnommen. Auf dem Boden befindliche Pflanzenteile und Steine wurden entfernt, sowie die ersten 5 cm des Bodens wurden abgetragen, um Verunreinigungen zu vermeiden. Dann wurden die Proben aus der Humusschicht bzw. dem Oberboden entnommen, indem ein steriles 10 ml-Röhrchen in den Boden gedreht wurde. Die Röhrchen mit den Bodenstanzen wurden dann verschlossen, gekühlt transportiert und unmittelbar nach der Ankunft im Labor verarbeitet.

2.2.2 Verarbeitung der Bodenproben und Isolierung der Bakterien

Die Bodenproben wurde abgewogen (1 g) und in ein 50 ml-Röhrchen mit 25 ml Nährbouillon gegeben. Anschließend wird das Gemisch für eine Minute mit dem Ultraturrax bei Raumtemperatur durchmischt und danach für 15 min im Überkopfschüttler rotierend geschüttelt. Die Proben wurden a) direkt und b) nach 24-stündiger Anreicherung (Überkopfschüttler bei 37°C) auf Nährböden aufgetragen. Hierzu wurden je 100 µl der Probe parallel auf *Klebsiella*-Selektivagar, sowie auf Chinablau-Laktose-Agar ausplattiert und 48h bei 37°C inkubiert. *Klebsiella*-verdächtige Kolonien (Chinablau-Laktose-Agar: Laktose-positiv, *Klebsiella*-Selektivagar: gelbe Kolonien) wurden isoliert und zur Reinkultur gebracht.

2.2.3 Spezies-Bestimmung

Die Identifikation der Isolate erfolgte anhand verschiedener kulturell-biochemischer Reaktionen (Tabelle 1).

Initial wurden verdächtige Isolate auf eine negative Oxidase- und positive Nitrat-Reaktion getestet. Die weitere Differenzierung erfolgte mittels des API 20 E-Systems (bioMérieux, Frankreich). Hierzu gehören unter anderem der Nachweis zur Bildung von H₂S sowie der Bildung von Indol aus Tryptophan, der Ureaseaktivität, der Nach-

weis zum Abbau der Aminosäuren Ornithin, Lysin und Arginin sowie von Citrat sowie der Nachweis von Unbeweglichkeit (Edwards und Ewing, 1972).

Weiterhin erfolgte die Differenzierung durch spezielle Nachweismethoden, die im mikrobiologischen Routinelaboratorium üblicherweise nicht angewendet werden:

- Assimilation von m-Hydroxy-Benzoesäure (Lütticken et al., 1979). Das Wachstum des zu untersuchenden Stammes wurde auf einem Nährboden getestet, in dem Hydroxy-Benzoesäure (4 g/l) die einzige Kohlenstoffquelle darstellt. Der Reaktionsausfall (Wachstum ja/nein) wurde nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und nach weiteren 72 Stunden bei Raumtemperatur abgelesen.

- Gasbildung aus Laktose bei 44,5°C (Naemura und Seidler, 1978). Dieser Test, der auch als fäkal-coliformer Test bezeichnet wird, dient dem Nachweis von Gasbildung, die anhand eines Durham-Röhrchens in der Laktosebouillon festgestellt werden kann.

- Verflüssigung von Pektin (Polygalakturonsäure) (Starr et al. 1977; von Riesen, 1976). Dazu wurden die Teststämme auf einen Natrium-polygalakturonsäure-haltigen Agar geimpft. Pektinolytische Bakterien sind durch die Einsenkung ihrer Kolonien in den Agar charakterisiert, die nach ein bis zwei Tagen Bebrütung bei 37°C erkennbar wird.

- Vergärung von D-Melzitose und L-Sorbose (Edwards und Ewing, 1972). Zum Nachweis der Zuckervergärung wurden Nährmedien verwendet, die als säurebildendes Substrat 1% D-Melzitose oder L-Sorbose enthalten. Der Reaktionsausfall konnte nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C abgelesen werden.

- Verwertung von Hydroxy-L-Prolin (Mori et al. 1989). In diesem Test enthält der Agar 0,4%iges Hydroxy-L-Prolin als einzige Kohlenstoffquelle. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C und weiteren 72 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Wachstum protokolliert.

- Wachstum bei 10°C (Naemura und Seidler, 1978). Das Testisolat wurde auf einen Schrägagar (Nutrient-Agar) überimpft und bei 10°C bebrütet. Nach fünf Tagen wurde das Wachstum abgelesen.

Tab. 1: Differenzierungsschema von Klebsiellen-Spezies anhand ihrer Stoffwechselleistungen (aus Podschun und Ullmann, 1998)

Merkmal	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subspecies pneumoniae</i>	<i>subspecies ozaenae</i>	<i>ssp. rhinoscleromatis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
Bildung von Indol	—	—	—	+	—	v	+
Ornithin-Decarboxylase	—	—	—	—	—	—	+
Lysin-Decarboxylase	+	v	—	+	+	+	+
Pektin-Abbau	—	—	—	+	—	—	—
Gas aus Laktose bei 44,5°C	+	—	—	—	—	—	—
Wachstum bei 10°C	—	—	—	+	+	+	+
Säurebildung aus D-Melezitose	—	—	—	v	+	—	—
Säurebildung aus L-Sorbose	v	nt	nt	+	+	+	nt
Assimilation von:							
-m-Hydroxy-Benzoesäure	—	—	—	+	+	—	—
- Hydroxy-L-Prolin	v	nt	nt	v	v	+	nt
- Malonat	+	—	+	+	+	+	+
Methylrot-Test	—	+	+	—	+	v	+
Voges-Proskauer-Test	+	—	—	+	+	+	+

Fettdruck von Merkmalen zeigt Nachweis über mikrobiologisch-diagnostische Standardmethode an. v = variabel; nt = not tested

2.2.4 Stammhaltung

Nach Isolierung wurden alle Bakterien in Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI) kultiviert, mit 30% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Erst zur Testung wurden die Stämme wieder aufgetaut, auf Bitter-Neu-Agar für 24 Stunden bei 37°C bebrütet und auf Reinheit geprüft.

2.3 Bestimmung der Serumempfindlichkeit

2.3.1 Serumgewinnung

Das Serum von 120 gesunden Spendern wurde 10 min bei 250 x g zentrifugiert, anschließend dekantiert, gepoolt und über eine Membran (Porengröße 0,2µm) filtriert. Für die spätere Verwendung wurde das Serum bei -80°C eingefroren.

2.3.2 Serumresistenztest

Die bakterizide Wirkung von humanem Normalserum auf die zu testenden Klebsiellen-Isolate wurde nach der leicht modifizierten Methode von Hughes et al. (Hughes et al., 1992) getestet.

Hierzu wurden jeweils 10 ml BHI-Bouillon mit 50 µl einer Vorkultur der zu untersuchenden Bakterienstämme inokuliert und für circa 3 Stunden bei 37°C inkubiert, so dass die frühlogarithmische Wachstumsphase erreicht wurde. Anschließend wurde durch photometrische Extinktionsmessung bei 578 nm anhand einer vorher erstellten Eichkurve die Keimzahl ermittelt. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert (1800 x g, 10 min), dreimal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen und auf eine Keimzahl von 2×10^6 /ml eingestellt. Je 50 µl Bakteriensuspension und 150 µl Poolserum wurden in Reaktionskavitäten von Mikrotiterplatten mit U-Boden pipettiert, vermischt und bei 37°C inkubiert. Über drei Stunden wurde die Entwicklung der Lebendzellzahl der Bakterien beobachtet. Dazu wurden aus jeder Testkavität nach sorgfältiger Durchmischung zu Beginn (t_0) und nach 1, 2, und 3 Stunden (t_1 , t_2 , t_3) sowohl 25 µl direkt auf die Agarplatte gegeben und ausgespatelt, als auch Verdünnungsstufen von 1:100 und 1:10.000 mit einem Spiralplater auf BHI-Agar gebracht. Bei der Spiralplattiermethode wird die Probenflüssigkeit (0,0492 ml) automatisch auf eine sich drehende Agarplatte aufgetragen.

Jeder Stamm wurde im Doppelansatz getestet. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Kolonie-bildenden Einheiten bestimmt.

Entsprechend der Methode von Hughes et al. wurde das Verhalten der Bakterien gegenüber humanem Poolserum anhand ihrer Überlebensrate nach verschiedenen Zeitintervallen mittels einer sechsstufigen Skala bewertet:

- Stufe 1: nach 1 und 2 Stunden <10%, nach 3 Stunden <0,1% des Inokulums
- Stufe 2: nach 1 und 2 Stunden <100%, nach 3 Stunden <10%
- Stufe 3: nach 1 Stunde >100%, nach 2 und 3 Stunden <100%
- Stufe 4: nach 1 und 2 Stunden >100%, nach 3 Stunden <100%
- Stufe 5: nach 3 Stunden >100% (aber Abnahme in einer der drei Stunden)
- Stufe 6: nach 3 Stunden >100% (permanente Zunahme)

In jeder Testreihe wurden als Methodenkontrollen die Isolate Nr. 41 als serumsensibler (Stufe 1) und Nr. 10 als serumresistenter (Stufe 6) *Klebsiella*-Stamm mitgeführt.

2.4 Kapseltypisierung

Die Kapseltypisierung wurde im *Klebsiella*-Referenzlabor des hiesigen Institutes (Konsiliarlaboratorium für Klebsiellen des Robert-Koch-Instituts) durchgeführt. Dazu wurden die Isolate 48 Stunden auf Saccharose-haltigem Agar (Worfel-Ferguson-Agar) angezüchtet und in der Kapselquellungsreaktion mit kapseltypspezifischen Antiseren untersucht (Ørskov und Ørskov, 1984; Ullmann, 1983).

2.5 Statistische Berechnungen

Zur Berechnung der Signifikanz der Häufigkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungskollektiven wurden Mehrfeldertafeln mit dem Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit geprüft, bei Zweifeldertafeln Yate's korrigiertes Chi-Quadrat-Verfahren angewandt. Bei Besetzungen von Feldern mit weniger als 5 Beobachtungen kam Fisher's Exakter Test zur Anwendung.

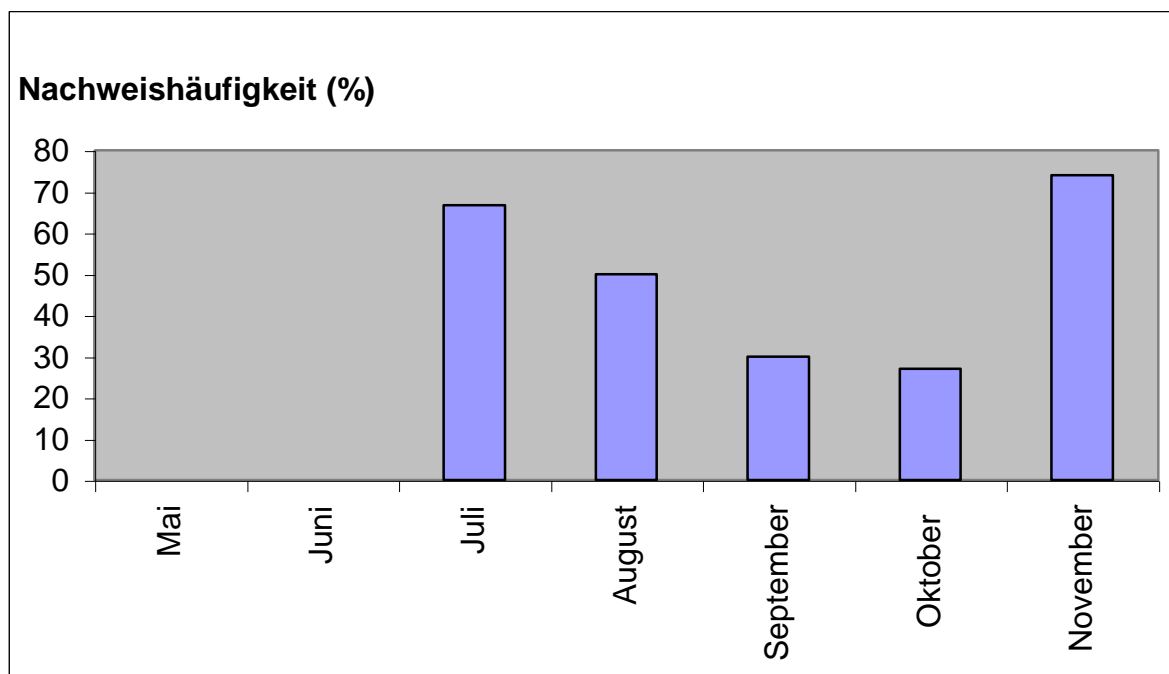
3 Ergebnisse

3.1 Nachweishäufigkeit

Es konnten in 213 Bodenproben aus 213 Entnahmestellen auf dem Gebiet der Stadt Kiel sowie dem Landkreis Rendsburg-Eckernförde (Wald: n=113, Knick/Feldrandhecke: n=50, Wiese: n=50) insgesamt 77 Klebsiellen-Stämme in 36,2 % der Proben isoliert werden. Dabei gelang in einzelnen Bodenproben auch der Nachweis von mehreren Klebsiellenstämmen.

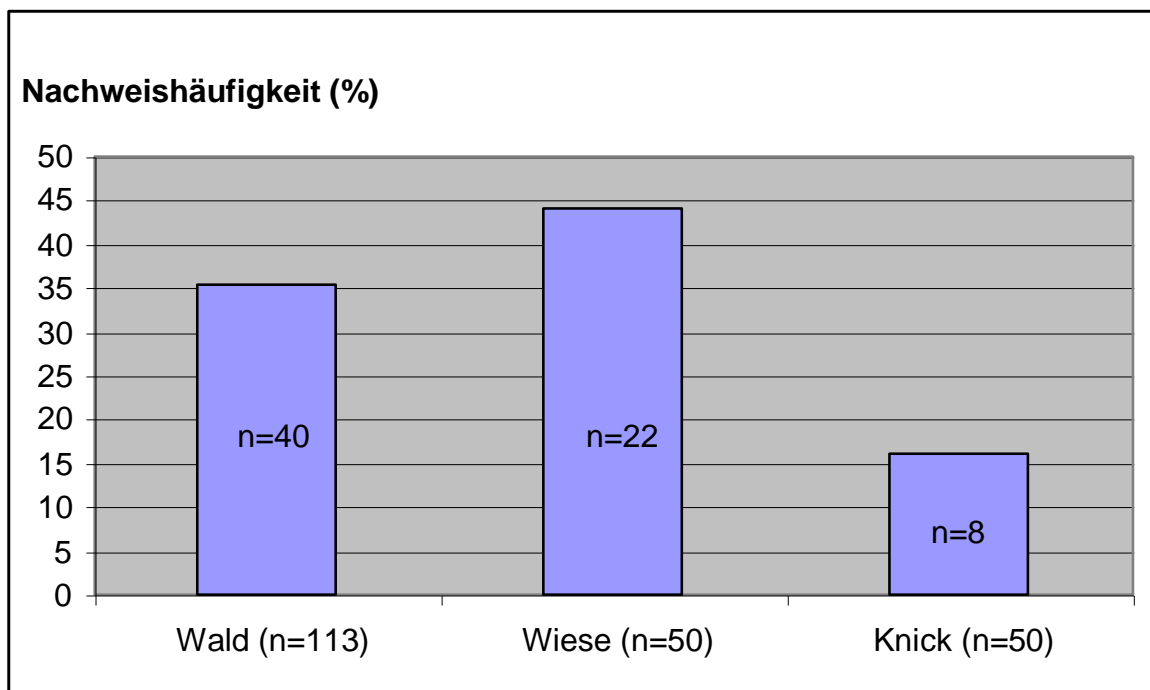
Der Beobachtungszeitraum lag in der Zeit von Mai bis November 2003, allerdings wurden im Mai und Juni aufgrund der Validierung verschiedener Nachweismethoden und konsekutiv dadurch eine geringe Anzahl an Proben keine Beobachtungen erreicht, so dass sich die Nachweisrate auf Juli bis November bezieht (Abb. 1).

Abb. 1: Nachweishäufigkeit von *Klebsiella* spp. in Bodenproben in Abhängigkeit von der Jahreszeit des Jahres 2003.



Ein Nachweis von Klebsiellen gelang in 35% der Proben aus dem Habitat Waldboden, in 44% der Proben aus dem Habitat Wiesenboden und in 16% der Proben aus dem Habitat Knick/Feldrandheckenboden (Abb. 2).

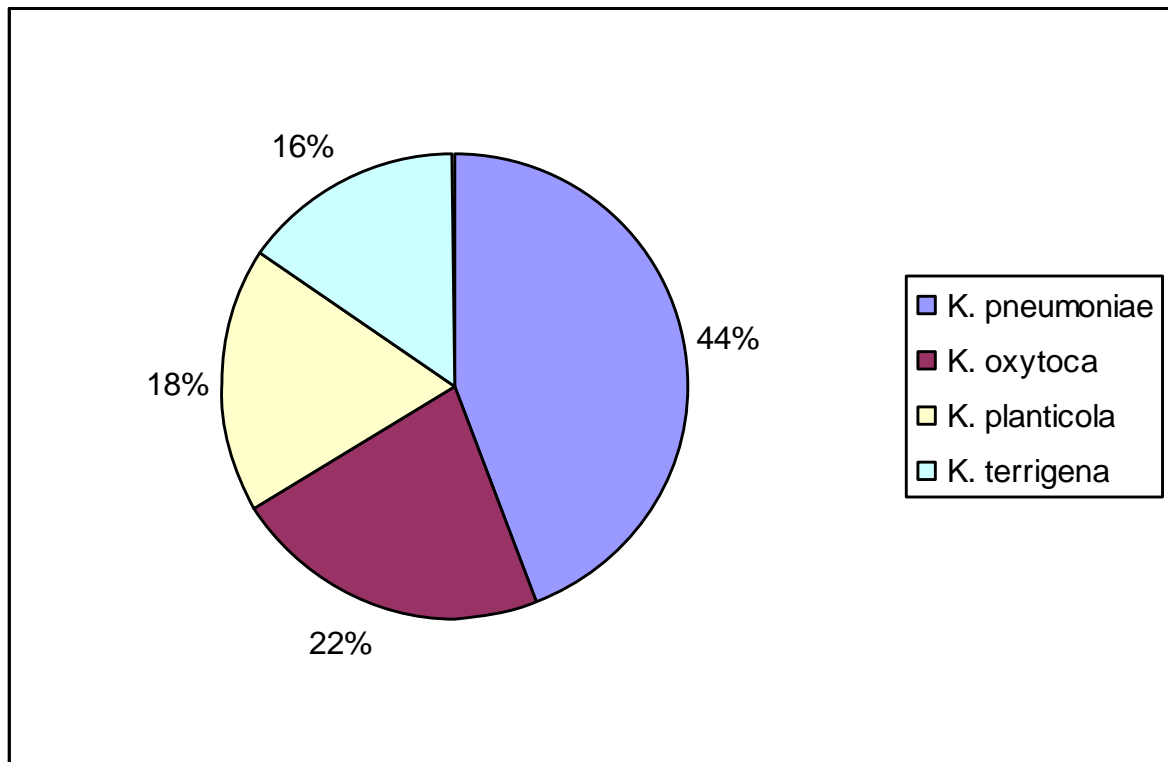
Abb. 2: Nachweishäufigkeit von *Klebsiella* spp. in Bodenproben in Abhängigkeit vom Habitat



3.2 Speziesverteilung

Bei der Untersuchung der Speziesverteilung zeigte sich, dass die klinisch bedeutendste Spezies *K. pneumoniae* mehr als doppelt so häufig vorkommt, wie die Umweltklebsiellenspezies *K. terrigena* und *K. planticola*. Diese weisen wie *K. oxytca* mit etwa 20 % ähnliche Häufigkeiten auf (Abb. 3, Tab. 2). Die Unterschiede in der Nachweishäufigkeit von *K. pneumoniae* und den anderen drei Klebsiellen-Spezies erwiesen sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Abb. 3: Speziesverteilung von *Klebsiella*-Isolaten (n=77) aus Bodenproben (n=213)



Tab. 2 zeigt, dass *K. pneumoniae* bei Isolaten aus allen Biotopen am häufigsten vorkommt. Im Biotop Waldboden kommt *K. oxytoca* am zweithäufigsten vor, gefolgt von *K. terrigena* und *K. planticola*. Im Biotop Wiesenboden kommt *K. planticola* am zweithäufigsten vor, gefolgt von *K. terrigena* und *K. oxytoca*. Im Biotop Knick/ Feldrandheckenboden kommen *K. pneumoniae* und *K. planticola* je dreimal so häufig vor wie *K. oxytoca* und *K. terrigena*. Aufgrund zu geringer Fallzahlen kann jedoch keine verlässliche statistische Aussage zu diesem Verteilungsmuster getroffen werden.

Tab. 2: Speziesverteilung von *Klebsiella*-Isolaten (n=77) aus verschiedenen Boden-Biotopen

Habitat	Waldboden	Wiesenboden	Knick/Feldrandhecke
<i>K. pneumoniae</i>	22 (50%)	9 (36%)	3 (37,5%)
<i>K. oxytoca</i>	12 (27%)	4 (16%)	1 (12,5%)
<i>K. planticola</i>	4 (9%)	7 (28%)	3 (37,5%)
<i>K. terrigena</i>	6 (14%)	5 (20%)	1 (12,5%)

3.3 Kapseltypen

Das Kollektiv der aus 213 Bodenproben isolierten 77 Stämme wurde hinsichtlich der Ausprägung von Serumresistenz und ihrer Kapseltypen untersucht. Anhand der Kapselquellungsreaktion konnten die Kapseln von 71 der 77 Bodenisolate (92,2%) typisiert werden. Nicht typisierbar waren 7% der *K. planticola*-, 8% der *K. terrigena*-, 6% der *K. oxytoca*- und 9% der *K. pneumoniae*-Stämme. Insgesamt wurden 30 Kapseltypen nachgewiesen, deren Verteilung in der Tab. 3 dargestellt ist.

Hierbei war bei *K. pneumoniae* der Kapseltyp K 5 und K 72 mit je 14,7% am häufigsten, während die Kapseltypen K 56, K 64, K 70 mit je 9% am zweithäufigsten vorkamen. Bei *K. oxytoca* dominierte der Kapseltyp K 35 mit 29%, K 21 war mit 12 % auch relativ häufig.

Bei *K. planticola* nahm K 56 mit 21,4% den Spitzenplatz in der Häufigkeitsverteilung ein, gefolgt von K 2 mit 14,3%. Hingegen überwog bei *K. terrigena* der Kapseltyp K 70 mit 16,6% während für alle anderen nachweisbaren Kapseltypen (K 5, K 32, K 33, K 34, K 42, K 12, K 29, K 31 und K 68) eine Häufigkeit von 8,3% festgestellt werden konnte.

Tab. 3: Häufigkeiten von Kapselserotypen bei *K. pneumoniae*-, *K. oxytoca*-, *K. planticola*-und *K. terrigena*-Isolaten aus Bodenproben. Die häufigsten speziesspezifischen Kapseltypen sind fett gedruckt.

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. terrigena</i>	Total
Kapseltyp (n=34)	(n=17)	(n=14)	(n=12)	(n=77)	
K 2	0	0	2 (14,3%)	0	2 (2,6%)
K 5	5 (14,7%)	0	1 (7,1%)	1 (8,3%)	7 (9,1%)
K 9	0	1 (5,9%)	0	0	1 (1,3%)
K 10	0	0	1 (7,1%)	0	1 (1,3%)
K 11	1 (2,9%)	0	0	0	1 (1,3%)
K 12	0	0	0	1 (8,3%)	1 (1,3%)
K 13	1 (2,9%)	0	0	0	1 (1,3%)
K 14	1 (2,9%)	0	1 (7,1%)	0	2 (2,6%)
K 21	2 (5,9%)	2 (11,8%)	0	0	4 (5,2%)
K 26	0	1 (5,9%)	0	0	1 (1,3%)
K 28	0	1 (5,9%)	0	0	1 (1,3%)
K 29	0	0	0	1 (8,3%)	1 (1,3%)
K 31	0	0	0	1 (8,3%)	1 (1,3%)
K 32	1 (2,9%)	1 (5,9%)	0	1 (8,3%)	3 (3,9%)
K 33	2 (5,9%)	0	0	1 (8,3%)	3 (3,9%)
K 34	1 (2,9%)	0	1 (7,1%)	1 (8,3%)	3 (3,9%)
K 35	1 (2,9%)	5 (29,4%)	0	0	6 (7,8%)
K 36	2 (5,9%)	0	0	0	2 (2,6%)
K 42	0	1 (5,9%)	0	1 (8,3%)	2 (2,6%)
K 51	0	0	1 (7,1%)	0	1 (1,3%)
K 53	0	0	1 (7,1%)	0	1 (1,3%)
K 56	3 (8,8%)	0	3 (21,4%)	0	6 (7,8%)
K 60	0	1 (5,9%)	0	0	1 (1,3%)
K 64	3 (8,8%)	0	0	0	3 (3,9%)
K 65	2 (5,9%)	0	0	0	2 (2,6%)
K 66	0	0	1 (7,1%)	0	1 (1,3%)
K 68	0	0	0	1 (8,3%)	1 (1,3%)
K 70	3 (8,8%)	1 (5,9%)	0	2 (16,6%)	6 (7,8%)
K 72	5 (14,7%)	0	0	0	5 (6,5%)
K 80	0	1 (5,9%)	0	0	1 (1,3%)
6 Isolate nicht typisierbar					

Bei der Verteilung der Kapseltypen auf die einzelnen Habitate kommt der Kapseltyp K 5 4 mal im Habitat Waldboden vor, K 21, K 32 und K 35 kommen je 3 mal vor (Tab. 4).

Tab. 4: Häufigkeiten von Klebsiellen-Kapselserotypen in verschiedenen Boden-Habitaten.

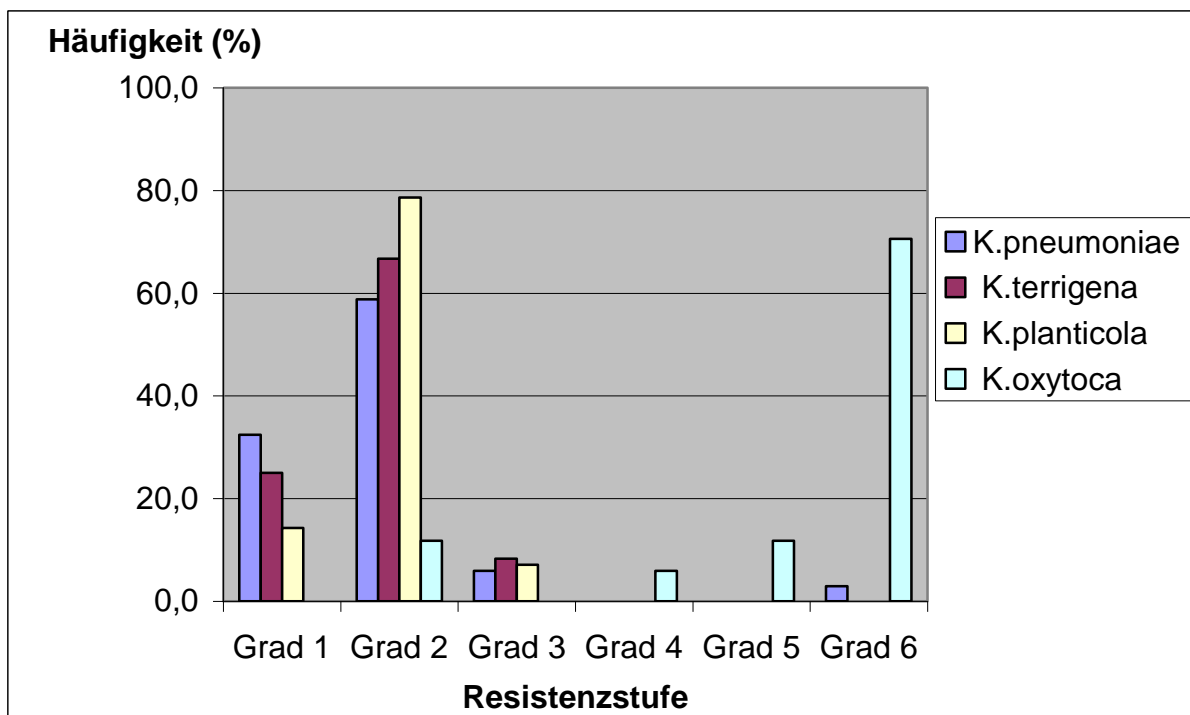
	Waldboden	Knick/ Feldrandhecke	Wiese	Total
Kapseltyp	(n=44)	(n=7)	(n=22)	(n=77)
K 2	2	0	0	2 (2,6%)
K 5	4	0	2	7 (9,1%)
K 9	1	0	0	1 (1,3%)
K 10	0	0	1	1 (1,3%)
K 11	1	0	0	1 (1,3%)
K 12	1	0	0	1 (1,3%)
K 13	0	0	1	1 (1,3%)
K 14	1	0	1	2 (2,6%)
K 21	3	0	1	4 (5,2%)
K 26	0	1	0	1 (1,3%)
K 28	1	0	0	1 (1,3%)
K 29	1	0	0	1 (1,3%)
K 31	0	1	0	1 (1,3%)
K 32	3	0	0	3 (3,9%)
K 33	1	0	2	3 (3,9%)
K 34	2	0	1	3 (3,9%)
K 35	3	0	2	5 (6,5%)
K 36	2	0	0	2 (2,6%)
K 42	2	0	0	2 (2,6%)
K 51	0	0	1	1 (1,3%)
K 53	1	0	0	1 (1,3%)
K 56	3	3	0	6 (7,8%)
K 60	0	0	1	1 (1,3%)
K 64	0	2	1	3 (3,9%)
K 65	1	0	1	2 (2,6%)
K 66	0	0	0	1 (1,3%)
K 68	0	0	1	1 (1,3%)
K 70	3	0	2	5 (6,5%)
K 72	3	0	2	5 (6,5%)
K 80	1	0	0	1 (1,3%)
	4 Isolate nicht typisierbar		2 nicht typisierbar	6 nicht typisierbar

3.4 Serumresistenz

Alle 77 Klebsiellen-Stämme wurden in Bezug auf die bakterizide Wirkung durch humanes Serum getestet: Hierbei wurde die Überlebensrate der *Klebsiellen*-Stämme gegenüber 75%igem Serum über einen Zeitraum von 3 Stunden bestimmt. Bei einer Einteilung des Serumresistenzverhaltens in 6 Stufen gelten die Stufen 1 und 2 als hochgradig sensibel, die Stufen 3 und 4 als mäßig empfindlich und die Stufen 5 und 6 als serumresistent.

Von den 77 untersuchten Stämmen waren 58 (75,3%) hochsensibel auf die bakterizide Wirkung humanen Serums, 4 Stämme (5,2%) waren mäßig empfindlich, und 15 (19,5%) waren serumresistent (Abb. 4). Das Merkmal Serumresistenz kam dabei fast nur bei *K. oxytoca* vor: Von 15 serumresistenten Stämmen waren 14 Stämme der Spezies *K. oxytoca* und 1 Stamm der Gattung *K. pneumoniae* zugehörig, während bei *K. planticola* und *K. terrigena* keine Serumresistenz nachzuweisen war. Bei den *K.-planticola*-Isolaten waren 11 (91,7%) hochgradig sensibel und bei den *K.-terrigena*-Isolaten waren 12 (92,9%) hochgradig sensibel wie auch bei *K. pneumoniae*, bei denen 31 Isolate (91,2%) hochsensibel waren.

Abb. 4: Häufigkeitsverteilung von Serum-Resistenzstufen bei Klebsiellen-Bodenisolaten verschiedener Spezies.



4 Diskussion

Klebsiellen sind häufige Erreger nosokomialer Infektionen, sogenannter *healthcare-associated infections* wie beispielsweise Katheter-assoziierte Infektionen, Beatmungspneumonien und Infektionen der Harnwege und Wunden einschließlich septischer Verläufe (Hidron et al. 2008). Hierbei spielen zum einen ein endogener Infektionsweg über die Darmflora und zum anderen ein exogener Infektionsweg zum Beispiel über die Hände von kontaminiertem Krankenhauspersonal oder kontaminiertem medizinischen Gerät eine Rolle (Abdel-Hady et al. 2008; Montgomerie 1979; Podschun und Ullmann 1998a).

Aufgrund dieser Tatsache spielen die Lebensräume in der Umwelt für deren Epidemiologie und die Beleuchtung der Übertragungswege eine entscheidende Rolle. Bis dato haben einige Untersuchungen gezeigt, dass Klebsiellen in der Umwelt aus verschiedenen Habitaten vorzufinden sind. So wurden Klebsiellen beispielsweise aus Gewässerproben (Matsen et al. 1974; Podschun et al. 2001; Cambell et al. 1976), von Gemüse- und Samenoberflächen (Brown und Seidler 1973), von Tannennadeln und Baumrinden (Duncan und Razzel 1972) und aus verschmutzten und unverschmutzten Bodenproben (Bagley 1985) nachgewiesen, jedoch liegen systematische Studien über ihre Häufigkeit in der natürlichen Umwelt kaum vor. Lediglich Podschun et al. 2001 haben in der aktuelleren Literatur systematisch das Vorkommen von Umweltklebsiellen aus Oberflächenwässern untersucht. Weiterhin hat man in früheren Studien vor Entdeckung der Spezies *K. planticola*, *K. terrigena* (1981) und *K. oxytoca* (1975) Klebsiellen lediglich als *K. pneumoniae* oder als KES-Gruppe (*Klebsiella-Enterobacter-Serratia*) identifiziert, so dass alle bis dahin publizierten Studien sich auf diese Spezies beziehen.

4.1 Vorkommen in Umwelthabitaten

In der hier vorgelegten Arbeit wurde in natürlichen, vegetationsbedeckten Böden ohne agrarische Chemieeinträge ein häufiges Klebsiellenvorkommen gefunden. Nach Bereinigung der multiplen Isolate pro Probe konnte eine Nachweisrate von 33% (70 von 213 Bodenproben) festgestellt werden. Am häufigsten gelang der Nachweis aus dem Habitat Wiesenboden (44%), gefolgt von Wäldern (35%) und Knicks (16%). Dabei wurden die Biotope Wald, Wiese und Knick/Feldrandhecke gewählt, da sie die typischen Vegetationsformen in Norddeutschland repräsentieren. Eine Erklärung be-

züglich des häufigeren Vorkommens von Klebsiellen in Wiesen- und Waldböden gegenüber Knicks/Feldrandhecken könnte darin bestehen, dass in diesen Biotopen ein feuchteres Milieu vorherrscht und Klebsiellen in diesen feuchten, fermentierten Böden bessere Wachstumsbedingungen vorfinden. In diesem Zusammenhang wäre dann auch zu sehen, dass Klebsiellen in den wurzelführenden Schichten der Rhizosphäre mit mehr gebundener Feuchtigkeit bessere Lebensbedingungen vorfinden. Ein weiterer Grund für das seltenere Vorkommen von Klebsiellen im Habitat Knick/Feldrandhecke könnte der größere Einfluss von klimatischen Witterungsbedingungen wie Wind mit konsekutiver Erosion und Austrocknung der oberen Bodenschichten sowie Regen mit Auswaschen der oberen Humusschicht sein, da Knicks diesen äußeren Einflüssen durch ihre leichte Erhöhung stärker ausgesetzt sind, als Wiesen und Wald.

Kritisch zu hinterfragen ist das häufigere Vorkommen von Klebsiellen im Habitat Wiesenboden im Vergleich zu Wald- und Knickböden. Hier könnten fäkale Verunreinigungen im Sinne von Kontaminationen aus der Faekalflora von Nutztieren durch z. B. früheren Gülleeintrag nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wurde versucht dieses zu vermeiden, indem die Proben aus nicht agrarisch genutzten Flächen gewonnen wurden.

4.2 Speziesverteilung

In Kongruenz mit den Untersuchungen aus klinischem Material (Hidron et al. 2008) sowie den Untersuchungen von Oberflächengewässern (Podschun et al. 2001) ist auch bei den Isolaten aus Bodenproben *K. pneumoniae* die häufigste Spezies, gefolgt von *K. oxytoca*. Die 1981 entdeckten „neuen“ Spezies *K. planticola* und *K. terrigena* (Dufour und Cabelli 1976; Izard et al. 1981), die ursprünglich beide als reine Umweltklebsiellen galten, waren ebenfalls mit einer Häufigkeit von 18% (*K. planticola*) und 16 % (*K. terrigena*) nachweisbar.

Da *K. planticola* nur vereinzelt und *K. terrigena* extrem selten in klinischen Prozessen nachweisbar ist (Freney et al. 1984; Mori et al. 1989; Podschun und Ullmann 1994), gelten beide weiter als Umweltklebsiellen, da ihre klinische Relevanz eher gering erscheint. Der Nachweis von *K. terrigena* in Bodenproben stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Izard et al. (Izard et al. 1981) überein, dass *Klebsiella terrigena* (hauptsächlich) aus Boden- und Gewässerproben nachweisbar ist und steht im Ge-

gensatz zur Studie von Podschun und Pietsch, die in Oberflächengewässern aus Schleswig-Holstein *Klebsiella terrigena* nicht nachweisen konnten (Podschun et al. 2001). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Klebsiellen in natürlichen Bodenproben in Schleswig-Holstein verbreitet sind (>30%), und dass die klinisch bedeutsamste Spezies *K. pneumoniae* hierbei den Hauptteil stellt.

4.3 Nachweis von Virulenzfaktoren

Es gibt im Gegensatz zu klinischen Klebsiellen-Isolaten in der aktuellen Literatur nur wenige Untersuchungen zur Ausbildung von Pathogenitätsmerkmalen bei Klebsiellen aus Umwelthabitaten. Es liegen diesbezüglich Daten von Podschun et al. sowie von Struve et al. (Struve und Krogfelt 2004) vor: Während Podschun und Pietsch (Podschun et al. 2001) in ihrer Studie Kapselbildung, Nachweis von Fimbrien und Serumresistenzverhalten von Wasserklebsiellen und klinischen Isolaten untersuchten, evaluierten Struve und Krogfelt die Virulenz dieses Stammkollektivs im Tiermodell anhand Harnwegsinfektionen und Besiedlung des Intestinaltraktes und kamen bezüglich der Pathogenität zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während in ersterer Studie die Wasserisolate bezüglich Kapselbildung, Serumresistenz und Ausbildung von Pili (Hämagglutinine) seltener Pathogenitätsmerkmale ausbildeten als klinische Isolate, erwiesen sich bezüglich der Pathogenität im Tiermodell die Umweltisolate aus Oberflächengewässern ähnlich virulent wie Isolate klinischen Ursprungs. Beide Studien untersuchten jeweils das gleiche Kollektiv von Umweltklebsiellen aus Oberflächengewässern als Habitat, wobei das Risiko einer fäkalen Verunreinigung durch die Probenentnahme fernab von Abwassereinleitungen minimiert wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hier untersuchten Virulenzmerkmale offenbar nicht das Ausmaß der Pathogenität bestimmen. Hier sind möglicherweise andere, bisher nicht untersuchte Virulenzfaktoren von Bedeutung.

In der hier vorgelegten Studie sollte das Risiko fäkaler Kontamination mit pathogenen Stämmen aus humaner Stuhlflora dadurch minimiert werden, dass die Bodenproben aus natürlichen, vegetationsbedeckten und agrarisch nicht genutzten Böden gewonnen wurden. Entsprechend der Vorstellung, dass pathogene Klebsiellenstämme aus Verunreinigungen mit Stuhlflora kommen könnten, wurde die oberste Bodenschicht mit eventuellen fäkalen Verunreinigungen bei der Probenentnahme ausgespart.

Bei den in dieser Studie untersuchten Pathogenitätsmerkmalen Kapselbildung und Serumresistenz würde man analog zu den Untersuchungen über Pathogenitätsmerkmale bei Klebsiellen aus Oberflächengewässern erwarten, dass Klebsiellen aus dem Habitat natürlicher Erdboden weniger virulent sind als Klebsiellen aus klinischen Isolaten.

Die Mechanismen, die die Serumresistenz eines Bakteriums begründen, sind vielfältig und partiell noch nicht endgültig ge- und erklärt. Eine wichtige Rolle spielt hier zum einen die Ausbildung einer Polysaccharidkapsel aus komplexen sauren Polysacchariden mit Untereinheiten von 4-6 Zuckern (Cross et al. 1986; Horwitz und Silverstein 1980), und zum anderen die Lipopolysaccharidseitenketten (O-Antigene) an der Bakterienoberfläche (Porat et al. 1987, 1992; Lepper et al. 2003; Trautmann et al. 2004).

Dabei geht man davon aus, dass das Pathogenitätsmerkmal Serumresistenz für das Bakterium einen Vorteil darstellt, weil es das Überleben des Erregers im Wirt fördert und somit eine Infektion ermöglicht (Lepper et al. 2003; Tomas et al. 1986). Hierfür spricht auch die Tatsache, dass bei Infektionen mit Gram-negativen Bakterien häufig serumresistente Stämme isoliert werden und serumresistente Erreger auch häufiger aus Blut als zum Beispiel aus Stuhl oder Urin isoliert werden (Roantree und Rantz 1960; Taylor 1983; Vosti und Randall 1970). Insbesondere bei schweren septischen Verläufen von Infektionen mit *Klebsiella species* scheint die Serumresistenz eine zentrale Rolle zu spielen. Nimmt man also an, dass das Merkmal Serumresistenz die Virulenz des Erregers erhöht, so wäre zu erwarten, dass die Umweltklebsiellen aus dem Habitat Erdboden weniger häufig serumresistent sind, als Klebsiellen aus klinischen Prozessen.

Die vorliegende Studie konnte dieses im Vergleich mit Studien aus klinischen Isolaten (Hostacká und Klokocníková 2001; Podschun et al. 1991, 1993) bestätigen: Während in dieser Studie 75,2% der Klebsiellenstämme hochsensibel auf humanes Poolserum reagierte, zeigte die Studie von Hostacká und Klokocníková aus klinischen *Klebsiella*-Isolaten eine Serumresistenz inklusive intermediärer Resistenz von über 80%.

Wie schon in der Studie zur Untersuchung von Umweltklebsiellen aus Oberflächengewässern (Podschun et al. 2001) in Schleswig-Holstein ließ sich auch in dieser Studie ein deutlich höherer Anteil von serumresistenten Stämmen von *K. oxytoca* aus Umwelthabitaten als aus klinischen Isolaten nachweisen (Hostacká und Klokocniková 2001). Einen entsprechenden Korrelat mit vermuteter erhöhter Pathogenität und erhöhten Infektionszahlen in klinischen Prozessen lässt sich aber nicht bestätigen: *Klebsiella pneumoniae* ist die klinisch und in der Umwelt am häufigsten nachweisbare und virulenteste Klebsiellenspezies.

Das Merkmal Serumresistenz scheint also nur als ein Teilfaktor für die Virulenz eines Bakteriums verantwortlich zu sein. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Virulenz von Klebsiellen ist die Ausbildung einer Polysaccharidkapsel. Sie besteht aus komplexen sauren Polysacchariden mit Untereinheiten von 4-6 Zuckern und Uronsäuren als negativ geladenen Bestandteilen. Die massive Kapsel schützt das Bakterium vor Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten (Podschun et al. 1992; Simoons-Smit et al. 1986) und verhindert eine Abtötung des Bakteriums durch Komplementfaktoren des Serums durch Inaktivierung und Aufnahme der Komplementfaktoren (vor allem Faktor C3b) (Tomas et al. 1986). Weiterhin bietet die Kapsel Schutz vor frühen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems, wie zum Beispiel antimikrobielle Peptide und Proteine im Bronchialsystem (Campos et al. 2004) und sie reduziert die Fähigkeit des Bakteriums, an epitheliale Zellen gebunden zu werden. Im Hinblick auf Harnwegsinfektionen stellt die Kapsel einen wichtigen Virulenzfaktor da (Struve und Krogfelt 2003). Basierend auf der strukturellen Variabilität der Kapselpolysacchariduntereinheiten wurden 77 verschiedene Kapseltypen bei *Klebsiella* gefunden (Ørskov und Ørskov 1984). Dabei haben verschiedene Studien gezeigt, dass einige Kapselserotypen virulenter sind als andere. Insbesondere K1 und K2 spielen hier eine besonders wichtige Rolle (Keynan und Rubinstein 2007): So zeigten Yu et al. 2007, dass der Kapseltyp K1 und K2 (der mukoide Phänotyp) bei 94% der *K. pneumoniae* Isolate bei ambulant erworbener Pneumonie und bei 100% der *K. pneumoniae* Isolate bei invasivem Syndrom (Leberabszess, Meningitis, Endophthalmitis) vorlag, und dass Infektionen mit den Kapseltypen K1 und K2 im Maus-Tiermodell eine wesentlich höhere Mortalität aufwiesen, als andere Kapseltypen. Simoons-Smit et al. zeigten 1984 ebenfalls, dass im Hautinfektionsmodell mit experimentell induzierten Hautläsionen bei der Maus die Kapseltypen K1, K2, K4 und

K5 deutlich virulenter als andere, numerisch höhere Kapseltypen waren. Die Annahme, dass Umweltklebsiellen seltener Virulenzmerkmale ausbilden, und die hauptsächlich im klinischen Bereich virulenteren Kapseltypen K1 und K2 vor allem bei der Gattung *K. pneumoniae* seltener vorkommen, zeigt sich bestätigt: K1 kommt in dieser Arbeit bei Umweltklebsiellen gar nicht vor und K2 kommt nur bei 2 Isolaten von *K. planticola* vor. Von den Kapseltypen, die mit höherer Virulenz assoziiert werden (Podschun 1991), kommt bei *K. pneumoniae* bei Umweltstämmen lediglich K5 häufiger vor. Dieses könnte man als bestenfalls mäßiggradige Virulenz einiger Isolate innerhalb des insgesamt in vitro scheinbar wenig virulenten Umweltklebsiellenkollektivs betrachten. Bezüglich der Kapselverteilung auf die einzelnen Habitate lässt sich aufgrund geringer Fallzahlen der einzelnen Kapseltypen in den Habitaten keine richtungweisende Interpretation treffen.

Zusammenfassend werden aus den Daten der vorliegenden Untersuchung folgende Schlussfolgerungen gezogen:

- Klebsiellen kommen in natürlichen Böden in Schleswig-Holstein häufig vor (>30%).
- Analog zu Befunden bei klinischen Isolaten kommt *K. pneumoniae* auch bei Umweltklebsiellen als häufigste Spezies vor.
- *K. terrigena* kommt als Umweltklebsielle in Bodenproben häufiger als in klinischen Prozessen und häufiger als in Oberflächengewässern vor, aber
- Umweltklebsiellen bilden seltener Virulenzfaktoren aus als Klebsiellen aus klinischen Prozessen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Deutschland zum ersten Mal epidemiologische Daten über das Vorkommen von Umweltklebsiellen in natürlichen Bodenproben gewonnen. Nachdem epidemiologische Daten auch für Oberflächengewässer vorliegen, müsste man für eine repräsentative Aussage im Hinblick auf das Habitat ubiquitäre Umwelt weitere Untersuchungen mit Isolaten aus anderen Habitaten, wie zum Beispiel Pflanzen, untersuchen. Um das Infektionsrisiko mit Klebsiellen aus Umwelthabitaten näher zu beleuchten, müssten weitere Untersuchungen zu den Pathogenitätsmerkmalen erfolgen.

5 Zusammenfassung

Klebsiellen sind gramnegative, unbewegliche und bekapselte Stäbchenbakterien und kommen im Nasopharynx und Gastrointestinaltrakt des Menschen und auch ubiquitär in der Umwelt (Wasser, Boden, Pflanzen) vor. Sie gelten weltweit als bedeutende Erreger nosokomialer Infektionen wie Harnwegsinfekte, Pneumonien und Sepsis. Klebsiellen sind hinsichtlich ihrer klinischen Epidemiologie relativ gut untersucht, doch Daten zur Epidemiologie von Umweltklebsiellen bezüglich Häufigkeit, Speziesverteilung und Ausbildung von Virulenzmerkmalen liegen derzeit nur sporadisch vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Vorkommen und die Speziesverteilung von Klebsiellen im Umwelthabitat natürlicher Erdboden sowie die Ausbildung von Virulenzfaktoren zu untersuchen.

Dazu wurden 213 Bodenproben aus den die Landschaft von Schleswig-Holstein prägenden Biotopen Wiese, Wald und Knick/Feldrandhecke gewonnen und nach Anreicherung in einer Nährboullion auf einen Klebsiellen-Selektivagar (Citrat/Inosit) gebracht. Insgesamt konnten aus 70 (33%) der 213 untersuchten Bodenproben 77 verschiedene *Klebsiellen*-Stämme isoliert werden, von denen 44% der Spezies *K. pneumoniae* angehörten (22% *K. oxytoca*, 18% *K. planticola*, 16% *K. terrigena*). Die Annahme, dass die in klinischen Studien sehr selten vorkommende und klinisch eher für bedeutungslos gehaltene Umweltklebsielle *K. terrigena* in natürlichen Böden deutlich häufiger vorkommt als die klinisch bedeutsamste Spezies *K. pneumoniae*, ließ sich nicht bestätigen.

Unter der Annahme, dass Umweltklebsiellen im Vergleich zu klinischen Isolaten weniger Pathogenitätsmerkmale ausbilden, wurden die Isolate auf die Virulenzfaktoren Serumresistenz und Kapselserotyp untersucht. Serumresistenz spielt eine wesentliche Rolle bei septischen Verläufen von *Klebsiella*-Infektionen durch die erhöhte Persistenz des Erregers im Blutstrom. Die Kapsel bietet einen direkten Schutz vor Phagozytose und erschwert eine Aktivierung der Komplementkaskade. Bei der Untersuchung der 77 Klebsiellenstämme zeigte sich, dass im Vergleich mit bereits publizierten Daten zu klinischen Isolaten deutliche Unterschiede vorliegen: Umweltklebsiellen sind deutlich häufiger serumsensibel als klinische Isolate. Bei den 77 verschiedenen Isolaten aus dem Habitat Erdboden ließen sich die bei klinischen *K. pneumoniae* Iso-

laten virulentesten Kapselserotypen K1 und K2 nicht (*K. pneumoniae*) bzw. nur vereinzelt (*K. planticola*) nachweisen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Art *K. pneumoniae* nicht nur in der Klinik, sondern auch in der Umwelt die am weitesten verbreitete Klebsiellen-Spezies ist. Weiterhin deuten die Daten darauf hin, dass Umweltstämme jedoch deutlich seltener in der Lage sind, Virulenzfaktoren auszubilden. Dem systematischen Nachweis von Klebsiellen in der Umwelt aus natürlichen Oberflächengewässern und dem Erdboden sollten weitere Untersuchungen z. B. aus dem natürlichen Habitat Pflanzen folgen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdel-Hady, H., Hawas, S., El-Daker, M., El-Kady, R. (2008): Extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in neonatal intensive care unit. J. Perinatol. 28, 685-690
- Bagley, S.T. (1985): Habitat association of *Klebsiella* species. Infect. Control. 6, 52-58
- Bagley, S.T., Seidler, R.J., Talbot, H.W.J., Morrow, J.E. (1978): Isolation of *Klebsiellae* from within the living wood. Appl. Environ. Microbiol. 36, 178-185
- Bauerfeind, A., Rosenthal, E., Eberlein, E., Holley, M., Schweighart, S. (1993): Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV- β -lactamase among hospitalized patients. Infection 21, 18-22
- Bleich, A., Kirsch, P., Sahly, H., Fahey, J., Smoczek, A., Hedrich, H.J., Sundberg, J.P. (2008): *Klebsiella oxytoca*: opportunistic infections in laboratory rodents. Lab anim. 42, 369-375
- Bouza, E., Cercenado, E. (2002): *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. Semin Respir Infect. 17, 215-230
- Brown, C., Seidler, R.J. (1973): Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. Appl. Environ. Microbiol. 25, 900-904
- Cambell, L.M., Michaels, G., Klein, R.D., Roth, I.L. (1976): Isolation of *Klebsiella pneumoniae* from lake water. Can. J. Microbiol. 22, 1762-1767
- Campos, M.A., Vargas, M.A., Regueiro, V., Llompарт, C.M., Alberti, S., Bengoechea, J.A. (2004): Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect. Immun. 72, 7107-7114
- Carpenter, J.L. (1990): *Klebsiella* pulmonary infections; occurrence at one medical center and review. Rev. Infect. Dis. 12, 672-682
- Ciurana, B., Tomás, J.M. (1987): Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. Infect. Immun. 55, 2741-2746
- Clegg, S., Schurtz-Sebghati, T.A. (2001): *Klebsiella pneumoniae*. In: Respiratory Infections, 1655-1680, Academic Press, London, San Diego
- Cross, A.S., Wright, K.S., Sadoff, J.C., Gemski, P. (1986): Role of lipopolysaccharide and capsule serum resistance of bacteremic strains of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 154, 497-503
- Cryz, S.J., Furer, F., Germanier, R. (1984): Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: role of capsular polysaccharide. Infect Immun. 43, 440-441
- D'Agata, E., Venkataraman, L., DeGirolami, P., Weigel, L., Samore, M., Tenover, F. (1998): The molecular and clinical epidemiology of enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase in a tertiary care hospital. J Infect. 36, 279-285
- Domenico, P., Diedrich, D.L., Straus, D.C. (1985): Extracellular polysaccharide production by *Klebsiella pneumoniae* and its relationship to virulence. Can. J. Microbiol. 31, 472-478

- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier, P. (2001) : Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 925-932
- Dufour, A.P., Cabelli, V.J. (1976): Characteristics of *Klebsiella* from textile finishing plant effluents. J. Water Pollut. Control Fed. 48, 872-879
- Duncan, D.W., Razzel, W.E. (1972): *Klebsiella* biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produce. Appl. Microbiol. 24, 933-938
- Edwards, P.R., Ewing, W.H. (1972): Identification of *Enterobacteriaceae*, 3rd ed., Burgess Publishing Company, Minneapolis
- Eisenstein, B. (2000): *Enterobacteriaceae*. In: Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennet, J.E. (Hrsg.), Principles and practice of infectious diseases, 5. Auflage, 2294-2310, Churchill Livingstone, New York
- Frank, M.M. (1980): Role of complement in resistance to infection, 87-100. In: Smith, H., Skehel, J.J., Turner, M. J. (Hrsg.), The molecular basis of microbial pathogenicity, Dahlem Konferenzen, Verlag Chemie, Weinheim.
- French, G.L., Shannon, K.P., Simmons, N. (1996): Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 β -lactamase. J. Clin. Microbiol. 34, 358-363
- Freney, J., Fleurette, J., Gruet, L.D., Desmonceaux, M., Gavini, F., Leclerc, H. (1984): *Klebsiella trevisanii* colonisation and septicemia. Lancet 1:8382, 909
- Hart, C.A. (1993): *Klebsiella* and neonates. J. Hosp. Infect. 23,83-86
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., Fridkin, S.K. (2008): NHSN annual update: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006- 2007. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 29, 996-1011
- Highsmith, A.K., Jarvis, W.R. (1985): *Klebsiella pneumoniae*: Selected virulence factors that contribute to pathogenicity. Infect. Control 6, 75-77
- Horan, T., Culver, D., Jarvis, W., Emori, G., Banerjee, S., Marton, W., Thornsberry, C. (1988): Pathogens causing nosocomial infections. Antimicrobic Newsletter 5, 65-67
- Horwitz, M., Silverstein, S.C. (1980): Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. J. Clin. Invest. 65, 82-94
- Hostacká, A., Klokocníková, S. (2001): Antibiotic susceptibility, serum response and surface properties of *Klebsiella* species. Microbios. 104, 115-124
- Hughes, C., Phillips, R., Roberts, A.P. (1982): Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. Infect. Immun. 35, 270-275
- Ishida, T., Hashimoto, T., Arita, M., Ito, I., Osawa, M. (1998): Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan. Chest 114, 1588-1593

- Izard, D., Ferragut, C., Gavini, F., Kersters, K., De Ley, J., Leclerc, H. (1981): *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. Int. J. Syst. Bacteriol. 31 116-127
- Janda, J.M., Abbott, S.L. (1998): The genus *Klebsiella*. In: Janda, J.M., Abbott, S.L. (Hrsg.): The *Enterobacteria*, 110-130, Lippincott-Raven, Philadelphia-New York
- Kato, K., Bito, Y. (1978): Relationship between bacterial action of complement and fluidity of cellular membranes. Infect. Immun. 19, 12-17
- Keynan, Y., Rubinstein, E. (2007): The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. Int. J. Antimicrob. Agents. 30, 385-389
- Knittel, M.D., Seidler, R.J., Eby, C., Cabe, L. (1977): Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenetic origin. Appl. Environm. Microbiol. 34, 557-563
- Krech, U., Sonnabend, W. (1969): Infektionen durch *Klebsiellen*, S 264-275. In: Gsell, O., Mohr, W. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin
- Kresken, M., Hafner, D., Schmitz, F.J., Wichelhaus, T.A. für die Studiengruppe (2006): Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2004. Antiinfectives Intelligence, Rheinbach, 2006
- Lepper, P. M., Möricke, A., Held, T. K., Schneider, E.M., Trautmann, M. (2003): K-antigen-specific, but not o-antigen-specific natural human serum antibodies promote phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35, 93-98
- Lütticken, R., Korth, H., Pulverer, G. (1979): Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* variatio „oxytoca“. Zbl. Bakt. Hyg. A 244, 470-473
- Matsen, J.M., Spindler, J.A., Blosser, R.O. (1974): Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. Appl. Microbiol. 28, 672-678
- Mayhall, C.G. (1987): Surgical infections including burns. In: Wenzel, R.P. (Hrsg.): Prevention and control of nosokomial infections, 614-664, The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- Merino, S., Camprubi, S., Alberti, S., Benedi, V.J., Tomas, J.M. (1992): Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. Infect. Immun. 60, 2529-2535
- Montgomerie, J.Z. (1979): Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. Rev. Infect. Dis. 1, 264-271
- Mori, M., Ohta, M., Agata, N., Kido, N., Arakawa, Y., Ito, H., Komatsu, T., Kato, N. (1989): Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. Microbiol. Immun. 33, 887-895
- Naemura, L.G., Seidler, R.J. (1978): Significance of low-temperature growth associated with the faecal coliform response, indole production and pectin liquefaction in *Klebsiella*. Appl. Environ. Microbiol. 35, 392-396
- Ørskov, I., Five-Asbury, M.A. (1977): New *Klebsiella* capsular antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. Int. J. Syst. Bacteriol. 27, 386-387

- Ørskov, I., Ørskov, F. (1984): Serotyping of *Klebsiella*, p. 143-164. In: Bergan, T. (Hrsg.), Methods in Microbiology, Band 14. Academic Press, London
- Pan, Y.L., Fang, H.C., Yang, H.C., Lin, T.L., Hsieh, P.F., Tsai, F.C., Keynan, Y., Wang, J.T. (2008): Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. J. Clin. Microbiol. 46, 2231-2240
- Pitout, J.D. (2008): Multiresistant *Enterobacteriaceae*: new threat of an old problem. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 6, 657-669
- Podschun, R. (1991): Isolation of *Klebsiella terrigena* from human feces: biochemical reactions, capsule types, and antibiotic sensitivity. Zentralbl. Bakteriол. 275, 73-78
- Podschun, R., Ullmann, U. (1992): *Klebsiella* capsular type K 7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. J. Med. Microbiol. 36, 250-254
- Podschun, R., Ullmann, U. (1994): Incidence of *Klebsiella planticola* among clinical *Klebsiella* isolates. Med. Microbiol. Lett. 3, 90-95
- Podschun, R., Ullmann, U. (1998a): *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. 11, 589-603
- Podschun, R., Ullmann, U. (1998b): *Klebsiella*. In: Diagnostische Bibliothek: 54, 1-8, Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin
- Podschun, R., Fischer, A., Ullmann, U. (2000): Characterization of *Klebsiella terrigena* strains from humans: haemagglutinins, serum resistance, siderophore synthesis, and serotypes. Epidemiol. Infect. 125, 71-78
- Podschun, R., Penner, I., Ullmann, U. (1992): Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. Microbiol. Pathog. 13, 371-379
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., Ullmann, U. (2001): Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. Appl. Environ Microbiol. 67, 3325-3327
- Podschun, R., Sievers, D., Fischer, A., Ullmann, U. (1993): Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing urinary tract infections. J. Inf. Dis. 168, 1415-1421
- Podschun, R., Teske, E., Ullmann, U. (1991). Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolated from different sources. Zbl. Hyg. 192, 279-285
- Porat, R., Johns, M.A., McCabe, W.R. (1987): Selective pressures and lipopolysaccharide subunits as determinants of resistance of clinical isolates of gramnegative bacilli to human serum. Infect. Immun. 55, 320-328
- Porat, R., Mosseri, R., Kaplan, E., Johns, M.A., Shibolet, S. (1992): Distribution of polysaccharide side chains of lipopolysaccharide determine resistance of *Escherichia coli* to the bactericidal activity of serum. J. Infect. Dis. 165, 953-956
- Prince, S., Dominge, K., Cunha, B., Klein, N. (1997): *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. Heart Lung. 26, 413-417
- Roantree, R.J., Rantiz, L.A. (1960): A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bactericidal infection. J. Clin. Invest. 39, 72-81

- Rozenberg-Arska, M., Porsius, J.C., Jaarsma, E.Y., Verhoef, J. (1986): Bactericidal, bacteriolytic and opsonic activity of human serum against *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 22, 143-149
- Rüden, H. (1995): Nosokomiale Infektionen in Deutschland. Erfassung und Prävention (NIDEP-Studie); Teil1: Prävalenz nosokomialer Infektionen. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit Band 56, Nomos-Verlagsgesellschaft Baden-Baden
- Sahly, H., Podschun, R. (1997): Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropatic sequelae. Clin. Diag. Lab. Immunol. 4, 393-399
- Simoons-Smit, A.M., Verweij-van Vught, A.M.J.J., Kanis, I.Y., MacLaren, D.M. (1984): Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. J. Med. Microbiol. 17, 67-77
- Simoons-Smit, A.M., Verweij-van Vught, A.M.J.J., MacLaren, D.M. (1986): The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. J. Med. Microbiol. 21, 133-137
- Starr, M.P., Chatterjee, A.K., Starr, P.B., Buchanan, G.E. (1977): Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinic laboratory procedures. J. Clin. Microbiol. 6, 379-386
- Struve, C., Krogfelt, K.A. (2003): Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. FEMS Microbiol. Lett. 218, 149-154
- Struve, C., Krogfelt, K.A. (2004): Pathogenetic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. Environ. Microbiol. 6, 584-590
- Taylor, P.W. (1983): Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 47, 46-83
- Tomas, J.M., Benedi, V.J., Ciurana, B., Jofre, J. (1986): Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. Infect. Immun. 54, 85-89
- Tomas, J.M., Camprubi, S., Merino, S., Davey, M.R., Williams, P. (1991): Surface exposure of O1 serotype lipopolysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* strains expressing different K-Antigens. Infect. Immun. 59, 2006-2011
- Torres, A., Serra-Batlles, J., Ferrer, A., Jimenez, P., Celis, R., Cobo, E., Rodriguez-Roisin, R. (1991): Severe community acquired pneumonia; epidemiology and prognostic factors. Am. Rev. Respir. Dis. 144, 312-318
- Trautmann, M., Held, T.K., Cross, A.S. (2004): O antigen seroepidemiology of *Klebsiella* clinical isolates and implications for immunoprophylaxis of *Klebsiella* infections. Vaccine 22, 818-821
- Ullmann, U. (1983): The distribution of *Klebsiella pneumoniae* serotypes from sources and their sensitivity to cephalosporins. Infection 11, 28-31
- van Dijk, W.C., Verbrugh, H.A., van der Tol, M.E., Peters, R., Verhoef, J. (1979): Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation and opsonization. Infect. Immun. 56, 2723-2730

- van Kregten, E., Westerdal, N.A.C., Willers, J.M.N. (1984): New simple medium for selective recovery of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from human feces. J. Clin. Microbiol. 20, 936-941
- von Riesen, V.L. (1976): Pectinolytic, indole-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 143-145
- Vosti, K.L., Randall, E. (1970). Sensitivity of serologically classified strains of *Escherichia coli* of human origin to the serum bactericidal system. Am. J. Med. Sci. 259, 114-119
- Wardlaw, A.C. (1962): The complement-dependent bacteriolytic activity of normal human serum. I. The effect of pH and ionic strength and the role of lysozyme. J. Exp. Med. 115, 1231-1249
- Williams, P., Thomas, J.M. (1990): The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. Rev. Med. Microbiol. 1, 196-204
- Woodford, N., Zhang, J., Warner, M., Kaufmann, M.E., Matos, J., Macdonald, A., Brudney, D., Sompolinski, D., Navon-Venezia, S., Livermore, D.M. (2008): Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. J. Antimicrob. Chemother. 62:1261-1264
- Woolcock, J.B. (1988): Bacterial resistance to humoral defense mechanisms: an overview, p. 73-93. In: Roth, J.A. (Hrsg.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens, ASM, Washington D.C.
- Yu, V.L., Hansen, D.S., Ko, W.C., Sagnieri, A., Klugman, K.P., von Gottberg, A., Goosens, H., Wagener, M.M., Benedi, V.J. (2007): Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. Emerg. Infect. Dis. 13: 986-993
- Zarchi, A.A., Vatani, H. (2009): A survey on species and prevalence rate of bacterial agents isolated from cockroaches in three hospitals. Vector borne zoonotic Dis. 9: 197-200

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. sc. hum. R. Podschun für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas sowie seine hervorragende und geduldige Betreuung.

Dem Direktor des Instituts für Infektionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Herrn Prof. Dr. med. H. Fickenscher sowie dem ehemaligen Direktor dieses Instituts, Herrn Prof. Dr. med. U. Ullmann, danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung im Institut.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Medizinisch-Technischen Assistenten Frau Andrea Hölzgen und Herrn Frank Stender, die mich umfassend in den Laboralltag eingewiesen haben. Ihre hilfreichen und konstruktiven Vorschläge haben einen großen Beitrag zur Durchführung der Experimente geleistet.

Frau Dr. Laelia Rösler danke ich von ganzem Herzen für ihre stets hilfsbereite, aufmunternde Unterstützung bei der Redigierung und Korrektur dieser Arbeit und ihre unermüdlichen Nachhilfestunden am Computer.

Ein herzliches Dankeschön richte ich auch an Frau Kerstin Wicke, die mir bei einigen Ausflügen aufs Land für Probenentnahmen eine große Hilfe und unterhaltsame Begleitung war.

Abschließend danke ich meiner Mutter, Maria und meiner lieben Freundin Katrin Stender für Ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen. Sie hat entscheidend zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Rendtorff, Gerrit
Geburtsdatum	19.08.74
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Astrid und Dr. Kurt Rendtorff

Schulbildung

1984 - 1988	Grundschule Hardenbergschule Kiel
1985 - 1994	Gymnasium Kieler Gelehrtenschule
24.06.1994	Abitur

Wehrdienst

10/94 - 09/95	Heer/Lütjenburg
---------------	-----------------

Hochschulstudium

1995 - 2003	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
13.03.1998	Ärztliche Vorprüfung
23.03.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.03.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30.04.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.10.2004	Approbation

Klinik

04/04-09/07	AIP/Assistenzarzt in der Asklepios-Nordseeklinik, Westerland/Sylt
10/07-09/08	Assistenzarzt Städtisches Krankenhaus Kiel, Chirurgie

Aktuell

Seit 01/09	Weiterbildungsassistent Allgemeinmedizin Gemein- schaftspraxis Dr. Blanck/Doßmann, Westerland/Sylt
------------	---